

家蚕信使核糖核酸的分离及体外活性测定^{*}

ISOLATION OF MESSENGER RNA IN BOMBYX MORI AND IDENTIFICATION OF ITS ACTIVITY IN VITRO

总RNA的制备主要参考 Schutz 等 (1972) 的方法, 加以修改。除注明外, 实验操作控制在 4°C 以下。以家蚕幼虫的整体 (除去消化道) 为材料, 按 1 : 8 (W/V) 加入 pH8.3 缓冲液 (0.01M Tris, 0.075M NaCl, 0.005M EDTA, 0.5% SDS), 置组织捣碎机中迅速匀浆一分钟。加入 4 倍组织体积 (W/V) 90% 酚液 (9 份体积重蒸酚溶于 1 份体积 0.1M Tris 溶液中, 加入 0.1% 8-羟基喹啉, pH8.3) 及 4 倍组织体积氯仿-异戊醇 (24 : 1) 溶液, 在室温中剧烈震荡 15 分钟, 离心, 收集上层水相。再于中层及酚氯仿相内加入 4 倍组织体积 pH8.3 缓冲液, 震荡均匀后离心, 收集上层水相。将二次水相液合并, 加入 0.5 倍体积 90% 酚液及 0.5 倍体积氯仿-异戊醇, 同样震荡、离心, 收集上层水相。再重复用酚、氯仿-异戊醇处理, 直到无明显蛋白膜为止。收集上层水相, 加入固体醋酸钠使达到 2% 浓度, 用 2 倍体积冷无水乙醇置 -20°C 使沉淀。离心所得的沉淀溶于生理盐水中 (生理盐水体重量应不超过原组织重量)。再用无水乙醇同样沉淀二次, 把最后一次离心收集的沉淀溶解在 pH5 缓冲液 (5mM MgCl₂, 0.01M 醋酸钠) 中, 加入 DNase I (10 微克/毫升), 0°C 消化 30 分钟。再用冷乙醇反复沉淀三次, 获得的精制总 RNA 溶于生理盐水中进行紫外光吸收测定, 检定 $\frac{A_{260}}{A_{230}} > 2$, $\frac{A_{280}}{A_{260}} < 0.5$ 。用二

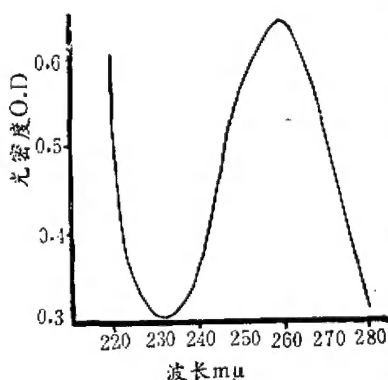


图1 家蚕总 RNA 紫外吸收光谱

苯胺法检验 DNA 为阴性反应。用 SPECORD UV VIS 分光光度计扫描得到典型的核酸紫外吸收曲线, 最高吸收峰为 259mμ, 最低吸收值在 232mμ 左右 (图 1)。

mRNAs 的分离

参考 Aviv 等 (1972) 的方法, 所用器皿、试液都需经过高压灭菌处理。

Oligo (dT) - 纤维素处理: 将适量 oligo (dT) 纤维素置小烧杯中, 加入 0.5M KCl, 0.01M Tris pH 8.5 的缓冲液, 搅匀后置冰箱浸泡过夜。然后小心装入夹套柱中, 再用该缓冲液滴加淋洗, 直至流出液 260mμ O. D < 0.03 时可供 RNA 上柱用。

^{*} 本工作有关活性测定部分, 得到中国科学院上海生化所及细胞所的支持和帮助, 并承云南省蚕业科学研究所提供家蚕幼虫, 特此一并致谢。

本文于 1980 年 4 月 5 日收到。

将制备的总RNA溶解于重蒸馏水中,配成25.O.D/毫升的浓度。离心弃去不溶性物质,吸取上清液,在冰浴条件下,每4毫升上清液中加入0.5毫升2.5M KCl、0.05M Tris pH8.5缓冲液,然后在25°C保温条件下逐步滴加到处理好的Oligo (dT)-纤维素柱中,流速控制在0.4毫升/分,接核酸检测仪检测。样品流完后,用0.5M KCl、0.01M Tris pH 8.5缓冲液充分洗脱,至洗脱液260mμ O. D < 0.03为止,使不含poly (A) 的RNA直接从柱上流出,含poly (A) 的mRNAs则亲和在柱上。然后用重蒸馏水洗一下柱壁,改用重蒸馏水洗脱mRNAs (图2)。检定所收集的mRNAs, $\frac{A_{260}}{A_{230}} > 2$, $\frac{A_{280}}{A_{260}} < 0.5$,用紫外分光光度计扫描得到(图3)的特性曲线。含poly (A) 的mRNAs的收率为2%左右。

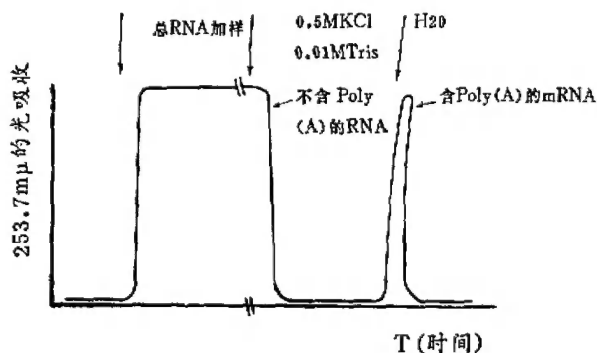


图2 Oligo(dT)-纤维素柱层析记银图

活性测定 我们选用麦胚无细胞蛋白合成系统对mRNAs进行体外活性测定,用家蚕蚁蚕的mRNAs作为样板,经过Sephadex G-25柱脱盐处理后,放在麦胚无细胞蛋白合成系统中进行翻译。以 ^3H -亮氨酸的参入量代表蛋白质的合成量,新合成的蛋白质经三氯醋酸处理使固定在滤纸片上,然后用NE8312液体闪烁仪进行同位素测量,在加入家蚕mRNAs的条件下,麦胚无细胞系统对 ^3H -亮氨酸参入有明显的刺激作用,促进程度达10倍说明所分离的家蚕mRNAs是具有生物活性的。

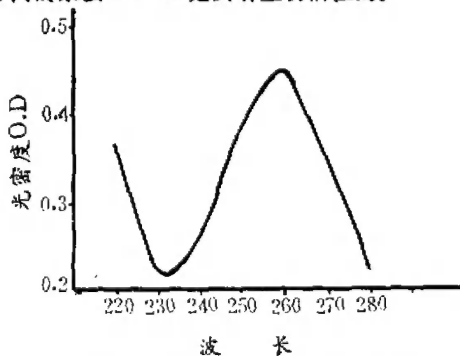


图3 家蚕mRNA紫外吸收光谱

参 考 文 献

- 中国科学院微生物研究所病毒复制研究组, 1976 小麦胚无细胞体系中TMV-RNA 指导的氨基酸参入。生物化学与生物物理学报 8 (2): 179—185。
- Aviv, H. and P. Leder 1972 Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 69, 1408—1412.
- Roberts, B. E. and Paterson, B. M. 1973 Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9s RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 70, 2330—2334.
- Schutz, G. M. Beato and P. Feigelson 1972 Isolation of eukaryotic messenger RNA on cellulose and its translation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 49, 680—689.

胡钧 叶文娟

(中国科学院昆明动物研究所)